

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
23 janvier 2003 (23.01.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 03/006639 A1

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12N 5/10,  
A01K 67/027, G01N 33/50, A61K 35/14, 48/00

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR02/02475

(22) Date de dépôt international : 12 juillet 2002 (12.07.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
01/09352 13 juillet 2001 (13.07.2001) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
GENOWAY [FR/FR]; 181-203, Avenue Jean Jaurès,  
F-69007 Lyon (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : THIAM,  
Kader [FR/FR]; 144, avenue de Saxe, F-69003 Lyon (FR).  
RATTIS, Frédérique [FR/FR]; 25, rue des Capucins,  
F-69001 Lyon (FR). BERTAUX, Fabien [FR/FR]; 10,  
Chemin des Mouilles, F-69290 Grezieu La Varenne (FR).  
FRAICHARD, Alexandre [FR/FR]; 144, avenue des  
États-Unis, F-78000 Versailles (FR).

(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet  
Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17  
(FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont  
requises

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: CELL AND TRANSGENIC ANIMAL MODELLING HUMAN ANTIGENIC PRESENTATION AND THEIR USES

(54) Titre : CELLULE ET ANIMAL TRANSGENIQUE MODELISANT LA PRESENTATION ANTIGENIQUE HUMAINE ET  
LEURS UTILISATIONS

(57) Abstract: The invention concerns an isolated animal cell comprising at least a transgene including at least a nucleotide sequence coding for at least a human polypeptide involved in the recognition and/or antigenic activation by T cells. The invention is characterised in that said cell, or a progeny of said cell, expresses at least all or part of the or said human polypeptide(s), and the homologous endogenous animal gene coding for an animal polypeptide homologous with said human peptide is invalid. The invention also concerns the corresponding transgenic animal. The cell and the transgenic animal of the invention can be used in a method for screening compounds which modulate an immune response in humans. The invention further concerns the use of the inventive cell as cell rendered autologous or tolerated by the immune system.

(57) Abrégé : L'invention se rapporte à une cellule animale, isolée, comprenant au moins un transgène comprenant au moins une séquence nucléotidique codant pour au moins un polypeptide humain impliqué dans la reconnaissance et/ou dans l'activation antigénique par les cellules T, caractérisée en ce que ladite cellule, ou une descendante de ladite cellule, exprime au moins tout ou partie du ou desdits polypeptide(s) humain(s), et caractérisée en ce que le gène animal endogène homologue codant pour un polypeptide animal homologue audit peptide humain est invalide. L'invention porte également sur l'animal transgénique correspondant. La cellule et l'animal transgénique selon l'invention peuvent être mis en oeuvre dans un procédé de criblage de composés qui modulent une réaction immunitaire chez l'homme. L'invention porte également sur l'utilisation de la cellule selon l'invention comme cellule rendue autologue ou tolérée par le système immunitaire.

WO 03/006639 A1

Cellule et animal transgénique modélisant la  
présentation antigénique humaine et leurs utilisations

5

La présente invention concerne le domaine de la  
biologie et plus particulièrement le domaine de la  
transgénèse animale et de l'immunologie. L'invention se  
rapporte à une cellule animale, isolée, comprenant au  
10 moins un transgène comprenant au moins une séquence  
nucléotidique codant pour au moins un polypeptide  
humain impliqué dans la reconnaissance antigénique  
et/ou dans l'activation cellulaire des cellules T,  
caractérisée en ce que ladite cellule, ou une  
15 descendante de ladite cellule, exprime au moins tout ou  
partie du ou desdits polypeptide(s) humain(s), et  
caractérisée en ce que le gène animal endogène  
homologue codant pour un polypeptide animal homologue  
audit polypeptide humain est invalide. L'invention  
20 porte également sur l'animal transgénique  
correspondant. La cellule et l'animal transgénique  
selon l'invention peuvent être mis en œuvre dans un  
procédé de criblage de composés qui modulent une  
réaction immune chez l'homme. L'invention porte  
25 également sur l'utilisation de la cellule selon  
l'invention comme cellule autologue ou tolérée par le  
système immunitaire pour la préparation d'un médicament  
destiné au traitement de patients nécessitant une  
greffe cellulaire et/ou tissulaire.

30 La reconnaissance d'un antigène par les cellules T  
fait intervenir un complexe tripartite composé des  
molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

situées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (APC), le peptide antigénique et le récepteur des cellules T (TCR). Ainsi, pour avoir une activation lymphocytaire T, il est nécessaire que le peptide soit correctement apprêté par les APC, puis associé aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (nommées H-2 chez la souris, HLA chez l'homme) et enfin exprimé à la surface des APC, pour que le complexe peptide-CMH présenté puisse être reconnu par le TCR spécifique.

Les molécules de CMH sont constituées de deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . Chacune de ces chaînes pouvant être codée par différents allèles présents sur le bras court du chromosome 6 (6p21.3) chez l'homme. Les loci codant pour les gènes des molécules de classe II sont centromériques et sont situés dans la région HLA-D (environ 900 kb). HLA-A contient au moins 20 gènes de classe II dont 9 sont fonctionnels : DPB1, DPA1, DQB1, DQB2, DRB1, DRB2, DRB4, DRB5, DRA. La région de classe I (environ 1600 kb) contient environ 20 gènes de classe I dont 8 sont officialisés par une nomenclature précise (A, B, C, D, E, F, G, H, J) ; seuls les produits A, B, C sont extensivement étudiés. Au niveau structural, les molécules du CMH de classe I sont formées d'une chaîne  $\alpha$  associée de façon non covalente à un polypeptide, la bêta 2 microglobuline ( $\beta 2m$ ).

Le polymorphisme HLA représente les variations au sein d'un locus dans une population. Chaque variation représente un allèle HLA. Par exemple, l'association d'une chaîne  $\alpha$  avec une chaîne  $\beta$  permet l'expression d'une protéine de CMH de classe II fonctionnelle,

possédant un site de liaison peptidique où vont se concentrer la majorité des variations polymorphes.

Ce phénomène, défini comme la restriction génique, influence les interactions peptide-CMH et explique en partie que certains individus répondent ou non à un antigène donné. Les modèles animaux (souris) ont permis dans un premier temps d'étudier la nature de la réponse immune mise en place (par exemple, Th1 versus Th2, réponse cellulaire versus humorale...). Cependant, ils ont montré leurs limites notamment dans les études de recherche d'un "candidat vaccinal" qui soit extrapolable à l'homme. Pour contourner en partie la restriction génique du CMH, des souris transgéniques exprimant un allèle donné du CMH ont été utilisées. Dans la plupart des cas, ces modèles ont été obtenus par transgénèse classique. Ceci signifie que le gène codant pour la molécule HLA est intégré de façon aléatoire dans le génome de la souris, l'effet du site d'intégration sur l'activité biologique du transgène ne pouvant pas être ignoré. De plus, ces premiers modèles obtenus par transgénèse classique effectuée pour des souris sauvages, expriment en plus de la molécule du CMH humain, les molécules du CMH murines endogènes. La réaction immune observée en réponse à un protocole de vaccination reflète alors la présentation de l'antigène par l'ensemble de ces deux types de molécules du CMH, humaine et murine. Une alternative à ce problème a consisté à croiser des souris transgéniques avec des souris présentant une inactivation ciblée de gènes du CMH murin (CMH I : Pascolo et al., 1997 ; CMH II : Ito et al., 1996).

Ces modèles, qui ne prennent en compte qu'un HLA donné, sont très réducteurs car naturellement un même individu exprime différents HLA. De plus, ces modèles ne sont pas pertinents car le transgène codant pour le HLA humain est intégré de manière aléatoire dans le génome, une telle intégration ayant nécessairement des conséquences sur la régulation et l'expression des gènes endogènes du site d'intégration ainsi que sur la régulation fine de l'expression du transgène. Ainsi, il existe un réel besoin de disposer d'animaux (souris ou autres) multi-transgéniques pour plusieurs molécules de CMH de classe I et/ou de classe II humaines décrites comme les plus représentatives d'une population donnée ; ces animaux constitueraient des outils d'une valeur considérable pour une pré-évaluation de la capacité de certaines molécules à déclencher une réponse immune chez l'homme. C'est le problème technique que se propose de résoudre la présente invention.

Afin de contourner les restrictions précitées, les inventeurs se proposent d'introduire plusieurs allèles HLA humains dans le génome d'animaux de laboratoire, de préférence chez la souris, et de couvrir ainsi un large éventail de la restriction génique humaine lié au CMH.

De préférence, les modèles de souris HLA multigéniques développées par les inventeurs expriment une à deux molécules HLA de classe I et/ou de classe II. En effet, l'association d'une molécule HLA de classe I et d'une à deux molécules HLA de classe II dans le même modèle serait un outil appréciable pour des études de vaccinologie. En effet, les molécules de classe I du CMH vont présenter les peptides exogènes aux

lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, responsables d'une réponse de type CTL (lymphocytes T cytotoxiques). Les molécules HLA de classe II vont présenter des peptides aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> qui, suite à leur activation, vont produire des cytokines et permettront ainsi le développement d'une réponse immune cellulaire et/ou humorale. En disposant d'un animal transgénique pour des molécules de classe I et II humaines, les deux composantes nécessaires à l'étude d'une réponse immune seront réunies, et le modèle obtenu permettra d'étudier un antigène (restreint classe I ) en association avec un peptide (restreint classe II) qui favorise le développement d'une réponse T globale. Malgré le fait que toutes les étapes précédant la présentation antigénique (apprêtement de l'antigène...) restent entièrement "murinisé", un tel modèle double transgénique présente une amélioration forte de sa relevance biologique.

Les inventeurs se proposent de supprimer l'expression des CMH murins afin de ne laisser s'exprimer que les gènes HLA humains introduits, augmentant d'autant la qualité du modèle. La technologie d'insertion ciblée (Knock-In), par exemple, est utilisée dans cette optique et évite les inconvénients d'une insertion aléatoire du transgène obtenue par transgénèse classique par microinjection d'ADN dans le pronucleus par exemple. Ainsi, les molécules du CMH murins seront invalidées en même temps que les molécules HLA humaines seront introduites. Ces gènes humains en lieu et place de leurs équivalents murins bénéficient de la régulation endogène s'exerçant

normalement sur l'expression des molécules du CMH pendant le développement d'une réponse immune.

Par cette même technique d'insertion ciblée, les inventeurs proposent d'humaniser la molécule  $\beta 2m$  pour éliminer les possibilités d'association entre molécules HLA classe I humaine et  $\beta 2m$  murine. La présentation d'antigène restreint aux molécules du CMH de classe I sera alors le plus proche possible de celle observée dans des cellules humaines.

Enfin, toujours dans l'optique d'augmenter la pertinence du modèle en fonction de ces applications potentielles, les inventeurs se proposent d'humaniser, en plus des molécules du CMH, d'autres molécules jouant un rôle important dans la reconnaissance des antigènes comme les co-récepteurs CD4 et CD8. Il a été démontré que les molécules CD4 et CD8 s'associent sous forme d'un complexe quaternaire avec le complexe TCR-CMH-peptide. Cette association n'a pas lieu dans des conditions satisfaisantes entre des molécules xénogéniques, ceci a été mis en évidence dans les premiers modèles de souris transgéniques portant un HLA humain incapable d'interagir avec le CD4 murin (Barzaga-Gilbert et al., 1992). Les molécules CD4 et CD8 engagées conjointement avec le TCR dans la liaison des complexes CMH-peptide peuvent stimuler des signaux intracellulaires essentiels dans le processus d'activation lymphocytaire. C'est pourquoi, l'invention concerne également un modèle de souris multi-transgénique HLA dans lequel est introduit par insertion ciblée dans le locus murin CD4 et CD8 correspondant, un gène chimère codant de préférence pour la partie extracellulaire de la molécule CD4 ou

CD8 humaine et pour la partie transmembranaire et intracellulaire de la molécule murine ; la reconnaissance CMH/CD4 ou CD8 est donc, dans un tel modèle animal, humaine, alors que la transduction du signal au sein du lymphocyte T est murine.

La présente invention se propose donc de fournir des modèles animaux, de préférence de souris, HLA multi-transgéniques humanisées pour toutes les molécules jouant un rôle clé dans l'initiation d'une réponse immune, tout en préservant la signalisation dans le lymphocyte T murin. L'invention vise donc à fournir une collection d'animaux de laboratoire multi-transgéniques HLA dans différents fonds génétiques qui seront autant de modèles expérimentaux pour une pré-évaluation de molécules d'intérêt (antigènes ou autres). L'évaluation ainsi réalisée sera très pertinente dans la mesure où la présentation de l'antigène se fera dans un contexte humanisé de manière optimale.

Les modèles selon l'invention constituent des modèles raffinés utiles à l'étude de la tolérance antigénique (induction ou rupture), la vaccinologie, les phénomènes allergiques et/ou inflammatoires (hypersensibilité retardée). Les animaux multi-transgéniques HLA selon l'invention permettront également de reproduire des modèles expérimentaux de pathologies auto-immunes décrites chez l'homme et associées à un ou plusieurs HLA donnés : par exemple en faisant exprimer des HLA qui sont observés en déséquilibre de liaison dans des populations et associés à des phénotypes de pathologie auto-immune.



Plus particulièrement, l'invention se rapporte à une cellule animale, isolée, comprenant au moins un transgène comprenant au moins une séquence nucléotidique codant pour au moins un polypeptide  
5 humain impliqué dans la reconnaissance antigénique et/ou dans l'activation cellulaire des cellules T, caractérisée en ce que ladite cellule, ou une descendante de ladite cellule, exprime au moins tout ou partie du ou desdits polypeptide(s) humain(s), et  
10 caractérisée en ce que ladite séquence nucléotidique est intégrée de manière stable dans le génome de ladite cellule par insertion ciblée par recombinaison homologue (« Knock-In ») au niveau d'au moins un, de préférence deux allèles dudit gène animal endogène,  
15 l'intégration de ladite séquence invalidant ledit gène animal endogène homologue.

Par polypeptide homologue au sens de la présente invention, on entend désigner des polypeptides d'espèces animales différentes, l'un étant humain,  
20 ayant facultativement une homologie de séquence substantielle et codant pour des polypeptides fonctionnellement équivalents dans les deux espèces animales.

Par polypeptide humain impliqué dans la  
25 reconnaissance antigénique et/ou dans l'activation cellulaire des cellules T, on entend désigner l'ensemble des molécules impliquées dans la reconnaissance antigénique et/ou dans l'activation cellulaire des lymphocytes T.

30 Par reconnaissance antigénique, on entend désigner la présentation de l'antigène aux cellules T par une molécule du CMH entraînant une activation desdites

cellules T et donc l'initiation et le développement d'une réponse immune.

Par activation cellulaire des lymphocytes T, on entend désigner l'ensemble de la cascade réactionnelle, induite suite à l'amorçage ("priming") de la réponse immune ou pathologique.

Le polypeptide humain impliqué dans la reconnaissance et/ou l'activation antigénique par les cellules T est sélectionné dans le groupe composé des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (HLA), de la  $\beta$ 2-microglobuline, les chaînes des récepteurs des cellules T (TCR), les polypeptides du complexe CD3, des co-récepteurs CD4 et CD8, les molécules costimulatrices ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, LFA-1, CD28, CD80, CD86, CD40, CD40L, CD5, CD72, CTLA-4, CD2, LFA-3. Plus précisément, ledit antigène du complexe majeur d'histocompatibilité est sélectionné dans le groupe composé des antigènes HLA de type I, de type II, de type III.

De préférence, mais de manière non limitative, ledit polypeptide humain est un antigène HLA de classe I humain qui est choisi de préférence parmi les antigènes HLA de classe I humain fonctionnels, de manière plus préférée dans le groupe composé de HLA-A2, HLA-A24, HLA-A1, HLA-A3, HLA-B7, HLA-B27, HLA-B44, HLA-B8, HLA-B35, HLA-Cw7, HLA-Cw3 et ledit polypeptide animal homologue invalidé est un antigène animal du CMH I qui est de préférence une molécule du CMH de classe I animal fonctionnel. De manière plus préférée, l'animal est la souris. L'antigène murin du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I invalidé est donc choisi en fonction du fond génétique murin. Ainsi, les

antigènes H2K et H2D sont de préférence inactivés chez les souris de souche 129 ou C57/Bl6, et l'antigène H2L chez les souris Balb/c.

De préférence, mais de manière non limitative, 5 ledit polypeptide humain est un antigène HLA de classe II humain qui est choisi de préférence parmi les antigènes HLA de classe II humains fonctionnels, de manière plus préférée dans le groupe composé de HLA-DR4, HLA-DR1, HLA-DR11, HLA-DR7, HLA-DR2, HLA-DR3, HLA-10 DQ8, HLA-DQ3, HLA-DP4 et ledit polypeptide animal homologue invalidé est un antigène animal du CMHII qui est de préférence une molécule du CMH de classe II animal fonctionnel. L'animal étant de préférence une souris consanguine ("In bred"), l'antigène murin du CMH 15 II a invalider est choisi en fonction du fond génétique murin ; ainsi, l'antigène I-E bêta, qui n'est pas exprimé et donc non fonctionnel dans la souche murine 129, n'est pas choisi lorsque la transgénèse ciblée est réalisée dans la souche 129. De préférence, les 20 antigènes I-A alpha, I-A bêta et I-E alpha sont invalidés dans les souris 129.

L'invention peut être réalisée dans n'importe quelle cellule de mammifère compétente pour la recombinaison homologue. De préférence, il s'agit de 25 cellules de rongeurs, notamment de souris, de rat, de hamster, de cobaye. De préférence, il s'agit de cellules de souris. Alternativement, il s'agit de cellules de primates - dont les cellules humaines -, tels que les singes, chimpanzés, macaques, babouins. Il 30 peut également s'agir de cellules de bovins, de caprins, d'ovins, de porcins, notamment de mini-porcs,

d'équidés tels que le cheval, de lagomorphes tels que le lapin.

Les cellules selon l'invention peuvent être définies fonctionnellement comme étant capables de  
5 réaliser la recombinaison homologue du ou des fragment(s) d'ADN exogène qui contient au moins une, de préférence deux, région(s) ayant des homologies de séquences avec une séquence d'ADN cellulaire endogène. De telles cellules contiennent naturellement des  
10 recombinaisons endogènes ou ont été génétiquement modifiées pour en contenir ou pour contenir les composés nécessaires pour réaliser la recombinaison de l'ADN.

De manière préférée, parmi les cellules selon  
15 l'invention, il convient de citer tous les types cellulaires exprimant naturellement des protéines spécifiques impliquées dans la reconnaissance et/ou l'activation antigénique par les cellules T. Il convient de citer les cellules du système immunitaire,  
20 les cellules présentatrices de l'antigène professionnelles et non professionnelles, les cellules souches hématopoïétiques.

Parmi ces cellules, il convient de citer les cellules du système immunitaire et de manière non  
25 exhaustive, les lymphocytes T matures et immatures, les thymocytes, les cellules dendritiques, les lymphocytes intra-épithéliaux, les cellules NK, les lymphocytes B, les basophiles, les mastocytes, les macrophages, les éosinophiles, les monocytes, les plaquettes, les  
30 cellules de Langerhans, les cellules dendritiques, les cellules présentatrices de l'antigène professionnelles et non professionnelles. Les cellules selon l'invention

peuvent également être par exemple des cellules neuronales. Il convient également de citer les cellules qui dans certaines conditions de culture, ou après différenciation ou manipulation génétique sont capables

5 d'exprimer des protéines spécifiques impliquées dans la reconnaissance et/ou l'activation antigénique par les cellules T. On peut citer les cellules souches hématopoïétiques, les cellules souches embryonnaires totipotentes (cellules ES) ou pluripotentes. Ces

10 cellules souches peuvent se différencier en une cellule exprimant les protéines spécifiques selon l'invention. Par cellules souches, on entend désigner tous les types de cellules indifférenciées multipotentes ou pluripotentes, cultivables *in vitro* de façon prolongée

15 sans perdre leurs caractéristiques, et qui sont susceptibles de se différencier en un ou plusieurs types cellulaires lorsqu'elles sont placées dans des conditions de culture définies. Ainsi, lorsque la cellule selon l'invention est une cellule ES ou une

20 cellule hématopoïétique, on peut envisager d'induire la différenciation de celle-ci en différents types cellulaires susceptibles d'exprimer la ou les protéines spécifiques de la reconnaissance et/ou de l'activation antigénique par les cellules T, telles par exemple les

25 cellules du système immunitaire, et plus précisément les mastocytes, les basophiles, les monocytes, les éosinophiles, les lymphocytes T matures et immatures, les thymocytes, les cellules dendritiques, les cellules NK, les lymphocytes B, les cellules de Langerhans, les

30 plaquettes, les monocytes, les cellules dendritiques, les cellules présentatrices de l'antigène professionnelles et non professionnelles.

Lorsqu'il est nécessaire d'employer des cellules souches embryonnaires (ES), pour la production de l'animal transgénique selon l'invention par exemple, une lignée cellulaire de cellules ES peut être employée  
5 ou des cellules embryonnaires peuvent être obtenues fraîchement à partir d'un animal hôte selon l'invention, en général d'une souris, d'un rat, d'un hamster, d'un cobaye. De telles cellules sont cultivées sur une couche de fibroblastes nourriciers appropriés  
10 ou sur de la gélatine, en présence de facteurs de croissance appropriés tels que du facteur inhibiteur de leucémie (LIF pour « *Leukemia Inhibitory Factor* »).

Plus généralement les cellules selon l'invention correspondent à toutes les cellules animales, de  
15 préférence de mammifères, à l'exception des cellules humaines. Des exemples de cellules de mammifères compétentes pour la recombinaison comprennent donc les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les cellules habituellement cultivées en  
20 laboratoire telles les cellules Hela, les cellules CHO (« *Chinese Hamster Ovary* »), Dorris, AE7, D10.64, DAX, D1.1, CDC25 par exemple.

Au sens de la présente invention, on entend désigner par transgénique une cellule comportant un  
25 transgène. On entend désigner par « transgène » ou par séquence d'acides nucléiques exogène ou par gène exogène du matériel génétique qui a été ou qui va être inséré artificiellement dans le génome d'un mammifère, particulièrement dans une cellule de mammifère cultivée  
30 *in vitro* ou dans une cellule de mammifère vivant, ou qui va se maintenir dans ladite cellule sous forme épisomale. De manière préférée, le transgène selon la

présente invention comprend au moins une séquence susceptible d'être transcrite ou transcrite et traduite en protéine. Le ou les transgènes selon l'invention ou leur expression n'affecte(nt) pas le fonctionnement du réseau biologique du système immunitaire, ni plus généralement le fonctionnement du réseau biologique de la cellule. Le transgène peut être cloné dans un vecteur de clonage qui permet d'en assurer sa propagation dans une cellule hôte, et/ou facultativement dans un vecteur d'expression pour assurer l'expression du transgène. Les technologies de l'ADN recombinant utilisées pour la construction du vecteur de clonage et/ou d'expression selon l'invention sont celles connues et communément utilisées par les hommes de l'art. Les techniques standard sont utilisées pour le clonage, l'isolement de l'ADN, l'amplification, et la purification ; les réactions enzymatiques impliquant l'ADN ligase, l'ADN polymérase, les endonucléases de restriction sont effectuées selon les recommandations du fabricant. Ces techniques et les autres sont généralement réalisées selon Sambrook et al., 1989). Les vecteurs incluent des plasmides, les cosmides, les phagemides, les bactériophages, les rétrovirus et autres virus animaux, les chromosomes artificiels, tels les YAC, BAC, HAC et autres vecteurs analogues.

Les méthodes pour générer des cellules transgéniques selon l'invention sont bien connues de l'homme de l'art (Gordon et al., 1989). Diverses techniques pour transfecter des cellules de mammifères ont été décrites (pour revue, voir Keon et al., 1990). Le transgène selon l'invention, facultativement compris

dans un vecteur linéarisé ou non, ou sous la forme d'un fragment de vecteur, peut être introduit dans la cellule hôte par des méthodes standard telles que par exemple la micro-injection dans le noyau  
5 (US 4 873 191), la transfection par précipitation au phosphate de calcium, la lipofection, l'électroporation (Lo, 1983), le choc thermique, la transformation avec des polymères cationiques (PEG, polybrène, DEAE-Dextran...), l'infection virale (Van der Putten et al.,  
10 1985), le sperme (Lavitrano et al., 1989).

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la cellule transgénique selon l'invention est obtenue par ciblage génique (« gene targeting ») du ou des transgène(s) au niveau d'une ou des séquences du  
15 génome de la cellule hôte. Plus précisément, le transgène est inséré de manière stable par recombinaison homologue au niveau de séquences homologues dans le génome de la cellule hôte. Lorsqu'il s'agit d'obtenir une cellule transgénique en vue de  
20 produire un animal transgénique, la cellule hôte est de préférence une cellule souche embryonnaire (cellule ES) (Thompson et al., 1989).

Le ciblage génique représente la modification dirigée d'un locus chromosomique par recombinaison  
25 homologue avec une séquence d'ADN exogène ayant une homologie de séquence avec la séquence endogène ciblée. On distingue différents types de ciblage génétique. Ainsi le ciblage génique peut être utilisé pour modifier, en général augmente l'expression d'un ou de  
30 plusieurs gène(s) endogène(s), ou pour remplacer un gène endogène par un gène exogène, ou pour placer un gène exogène sous le contrôle d'éléments de régulation



de l'expression génique de gène endogène particulier qui reste actif. Dans ce cas, il le ciblage génique est appelé « Knock-in » (KI). Alternativement, le ciblage génique peut être utilisé pour diminuer ou annihiler l'expression d'un ou plusieurs gènes. Il s'agit alors de ciblage génique appelé « Knock-Out » (KO) (voir Bolkey et al., 1989).

Selon la présente invention, l'intégration dans le génome de ladite cellule dudit transgène codant pour au moins un polypeptide humain impliqué dans la reconnaissance et/ou l'activation antigénique par les cellules T, constitue un « Knock-in » ; il est réalisé au niveau dudit ou desdits gènes endogènes codant pour un animal homologue codant pour undit ou desdits polypeptide(s) animal(animaux) de telle sorte que ledit transgène invalide l'expression dudit gène endogène. La cellule selon l'invention se caractérise en ce que le transgène est intégré de manière stable dans le génome de ladite cellule, et en ce que son expression est contrôlée par les éléments de régulation du gène endogène. Par intégration de manière stable, on entend signifier l'insertion du transgène dans l'ADN génomique de la cellule selon l'invention. Le transgène ainsi inséré est ensuite transmis à la descendance cellulaire. L'intégration du transgène est réalisée en amont, en aval ou au milieu du gène endogène cible. Selon un mode préféré de réalisation, la cellule selon l'invention exprime un ou plusieurs transgènes, codant chacun pour au moins un polypeptide humain impliqué dans la reconnaissance antigénique et/ou l'activation cellulaire des cellules T.

Pour réaliser la recombinaison homologue, il est nécessaire que le transgène contienne au moins une séquence d'ADN comprenant tout ou partie d'au moins le gène codant pour le polypeptide humain impliqué dans la reconnaissance antigénique et/ou l'activation des cellules T, avec éventuellement les modifications génétiques désirées et facultativement un ou plusieurs gènes de sélection positive ou négative, et également des régions d'ADN d'homologie avec le locus cible, de préférence au nombre de deux, situé de part et d'autre de la portion du gène rapporteur. Par «régions d'ADN d'homologies » ou «séquences d'ADN homologues ou substantiellement homologues », on entend désigner deux séquences d'ADN qui, après un alignement optimal et après comparaison, sont identiques pour environ au moins environ 75% des nucléotides, au moins environ 80% des nucléotides, habituellement au moins environ 90% à 95% des nucléotides et, de manière plus préférée, au moins environ 98 à 99,5% des nucléotides. Par «pourcentage d'identité» entre deux séquences d'acides nucléiques au sens de la présente invention, on entend désigner un pourcentage de nucléotides identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur toute leur longueur. On entend désigner par "meilleur alignement" ou "alignement optimal", l'alignement pour lequel le pourcentage d'identité déterminé comme ci-après est le plus élevé. Les comparaisons de séquences entre deux séquences d'acides nucléiques sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir

alignées de manière optimale, ladite comparaison étant réalisée par segment ou par « fenêtre de comparaison » pour identifier et comparer les régions locales de similarité de séquence. L'alignement optimal des

5 séquences pour la comparaison peut être réalisé, outre manuellement, au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981), au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Neddleman et Wunsch (1970), au moyen de la méthode de recherche de

10 similarité de Pearson et Lipman (1988), au moyen de logiciels informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI). Afin d'obtenir

15 l'alignement optimal, on utilise de préférence le programme BLAST, avec la matrice BLOSUM 62. On peut également utiliser les matrices PAM ou PAM250. Le pourcentage d'identité entre deux séquences d'acides nucléiques est déterminé en comparant ces deux

20 séquences alignées de manière optimale, la séquence d'acides nucléiques ou d'acides aminés à comparer pouvant comprendre des additions ou des délétions par rapport à la séquence de référence pour un alignement optimal entre ces deux séquences. Le pourcentage

25 d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide ou le résidu d'acide aminé est identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions comparées

30 et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le pourcentage d'identité entre ces deux séquences. Par séquences nucléiques présentant un

pourcentage d'identité d'au moins 85%, de préférence d'au moins 90%, 95%, 98% et 99% après alignement optimal avec une séquence de référence, on entend désigner les séquences nucléiques présentant, par  
5 rapport à la séquence nucléique de référence, certaines modifications comme en particulier une délétion, une troncation, un allongement, une fusion chimérique, et/ou une substitution, notamment ponctuelle, et dont la séquence nucléique présente au moins 85%, de  
10 préférence au moins 90%, 95%, 98% et 99% d'identité après alignement optimal avec la séquence nucléique de référence. La longueur des régions d'homologie est partiellement dépendante du degré d'homologie. Ceci est dû au fait qu'une diminution de la quantité d'homologie  
15 résulte dans une diminution de la fréquence de recombinaison homologue. Si des régions de non homologie existent entre les portions de séquences homologues, il est préférable que cette non homologie ne s'étale pas sur toute la portion de séquence  
20 homologue mais plutôt dans des portions discrètes. Dans tous les cas, plus le degré d'homologie est faible, plus la région d'homologie doit être longue pour faciliter la recombinaison homologue. Bien que aussi peu que 14 pb homologue à 100% soient suffisantes pour  
25 réaliser la recombinaison homologue dans les bactéries, dans les cellules de mammifère, des portions de séquences homologues plus longues sont préférées, en général. Ces portions font au moins 250 pb, 500 pb, 750 pb, 1 000 pb, 1500 pb, 1750 pb, 2000 pb, 2500 pb,  
30 3000pb, 4000 pb de préférence au moins 5 000 pb pour chaque portion de séquence homologue. Selon l'invention, les fragments d'ADN sont de n'importe

quelle taille. La taille minimale requise est subordonnée à la nécessité d'avoir au moins une région d'homologie suffisamment longue pour faciliter la recombinaison homologue. Les fragments d'ADN ont une  
5 taille d'au moins environ 2 kb, de manière préférée d'au moins environ 3 kb, 5 kb, 6 kb.

Le transgène n'est pas limité à une séquence particulière d'ADN. Ainsi les séquences d'ADN d'homologie présentes dans le transgène peuvent être  
10 d'une origine purement synthétique (par exemple réalisée en routine à partir d'un synthétiseur d'ADN), ou peuvent dériver de séquences d'ARNm par reverse transcription, ou peuvent dériver directement de séquences d'ADN génomique. Lorsque la séquence d'ADN  
15 d'homologie dérive de séquences d'ARN par reverse transcription, celle-ci peut contenir ou non tout ou partie de séquences non codantes telles les introns, selon que la molécule d'ARN correspondante a ou non subi, partiellement ou totalement, un épissage. De  
20 préférence, les séquences d'ADN homologue utilisées pour réaliser la recombinaison homologue comprennent des séquences d'ADN génomique plutôt que de l'ADN<sub>c</sub>. En effet, d'importantes séquences cis-régulatrices présentes dans les introns, les régions distales, les  
25 régions promotrices peuvent être présentes. Les séquences dérivant d'ADN génomique codent généralement au moins pour une portion de gène mais peuvent alternativement coder pour des régions non transcrites ou des régions d'un locus génétique non réarrangé  
30 telles que les loci des immunoglobulines ou du récepteur des cellules T. Généralement, les séquences d'ADN génomique incluent une séquence codant pour un

transcrit d'ARN. De préférence, le transcrit d'ARN code pour tout ou partie d'un polypeptide ; de préférence, il s'agit de polypeptides humains impliqués dans la reconnaissance antigénique et/ou l'activation  
5 cellulaire des cellules T. Lorsque le transgène code pour une partie de polypeptide, il s'agit de préférence d'un ou de plusieurs exons ; ainsi, dans le cadre de l'humanisation du gène murin de la bêta-2-microglobuline, le transgène utilise comprend de  
10 préférence un exon ; dans ce cas, le Knock-in est de préférence un échange d'exons. Alternativement, un même transgène peut coder pour plusieurs gènes humains. Dans ce cas, les gènes humains sont de préférence sous la forme d'ADNc et sont placés sous le contrôle de régions  
15 promotrices humaines. Lorsque plusieurs gènes humains sont ainsi liés de manière contiguë, ils sont soit disposés sous la forme de multiples entités géniques distinctes, comprenant chacun au moins un promoteur, des séquences régulatrices, une séquence codante, les  
20 signaux de terminaison, soit les séquences codantes sont dispersées en CIS, séparées par des « Internal ribosomal entry site » (IRES) et sont placées sous le contrôle d'un même groupe de séquences de régulation de la transcription et de la traduction.

25 De préférence, les IRES sont sélectionnés parmi l'IRES du virus de l'encéphalite du myocarde (EMCV), du cardiovirus, de l'aphtovirus, de l'entérovirus, du rhinovirus, notamment du rhinovirus humain (HCV), du virus de l'hépatite A, du poliovirus de type I, du  
30 virus de la maladie du pied et de la langue (FMDV, Foot and mouth disease virus), du virus ECHO, du virus de la leucémie murine (MLV) de cMyc.

Selon un mode préféré de réalisation, le transgène comprend au moins une séquence nucléotidique codant pour au moins tout ou partie d'un polypeptide humain impliqué dans la reconnaissance antigénique et/ou  
5 l'activation cellulaire des cellules T, une cassette de sélection positive encadrée ou non de sites-spécifiques à l'action des recombinaisons, par exemple une cassette  
Lox/Néo-TK/Lox ou lox/Néo/lox ou FRT/Néo-TK/FRT ou FRT/Néo/FRT pouvant être également présente en position  
10 5' de la dite séquence nucléotidique, et caractérisé en ce que une cassette de sélection négative contenant par exemple le ou les gènes DTA et/ou TK est présente à au moins une des extrémités du transgène.

Le transgène peut être aussi petit que quelques  
15 centaines de paires de bases d'ADN<sub>c</sub> ou aussi large qu'une centaine de milliers de paires de bases d'un locus génique comprenant la séquence codante exonique-intronique et les séquences de régulation nécessaires à l'obtention d'une expression contrôlée de manière  
20 spatio-temporelle. De préférence, le segment d'ADN recombiné a une taille comprise entre 2,5 kb et 1 000 kb. Quoi qu'il en soit, les segments d'ADN recombinés peuvent être inférieurs à 2,5 kb et supérieurs à 1 000 kb.

25 Le transgène de la présente invention est de préférence sous forme native, c'est-à-dire dérivé directement d'une séquence d'ADN exogène présente naturellement dans une cellule animale. Cette séquence d'ADN sous forme native peut être modifiée par exemple  
30 par insertion de sites de restriction nécessaires au clonage et/ou par insertion de sites de recombinaison site-spécifiques (séquences lox et flp).

Alternativement, le transgène de la présente invention peut avoir été créé artificiellement *in vitro* par les techniques de l'ADN recombinant, en associant par exemple des portions d'ADN génomique et/ou d'ADN<sub>c</sub>. Il s'agit là de transgène chimérique. La séquence d'ADN selon l'invention, sous forme native ou chimérique, peut être mutée en utilisant les techniques bien connues de l'homme du métier. Pour les séquences codantes, ces mutations peuvent affecter la séquence d'acides aminés.

Lorsque les cellules ont été transformées par le transgène, elles peuvent être cultivées *in vitro* ou bien être utilisées pour produire des animaux transgéniques. Après transformation, les cellules sont ensemencées sur une couche nourricière et/ou dans un milieu approprié. Les cellules contenant la construction peuvent être détectées en utilisant un milieu sélectif. Après un temps suffisant pour laisser les colonies pousser, celles-ci sont récupérées et analysées pour déterminer si un événement de recombinaison homologue et/ou une intégration de la construction s'est produite. Pour réaliser le criblage des clones susceptibles de satisfaire à la recombinaison homologue, des marqueurs positifs et négatifs, encore appelés gènes de sélection, peuvent être insérés dans le vecteur de recombinaison homologue. Différents systèmes de sélection des cellules ayant réalisé l'événement de recombinaison homologue ont été décrits ; il convient de citer le premier système décrit qui utilise des vecteurs de sélection positif/négatif (Mansour et al., 1988 ; Capecchi, 1989).



Par gène de sélection, on entend désigner un gène qui permet aux cellules qui le possèdent d'être sélectionnées spécifiquement pour ou contre la présence d'un agent sélectif correspondant. Pour illustrer ce

5 propos, un gène de résistance aux antibiotiques peut être utilisé comme un gène marqueur de sélection positif qui permet à une cellule hôte d'être sélectionnée positivement en présence de l'antibiotique correspondant. Une variété de marqueurs positifs et

10 négatifs sont connus de l'homme du métier (pour revue voir brevet US 5 627 059). Ce gène de sélection peut se trouver soit à l'intérieur ou à l'extérieur du transgène linéarisé. Lorsque le gène de sélection se trouve à l'intérieur du transgène, c'est-à-dire entre

15 les extrémités 5' et 3' du transgène, celui-ci peut être présent sous la forme d'une entité génique distincte du gène codant pour au moins un polypeptide humain impliqué dans la reconnaissance antigénique et l'activation cellulaire des cellules T selon

20 l'invention. Dans ce cas, le gène de sélection est lié de manière opérationnelle avec des séquences d'ADN permettant de contrôler son expression ; alternativement le gène de sélection peut être mis sous le contrôle des séquences de régulation de l'expression

25 dudit gène humain. Ces séquences, connues de l'homme du métier, correspondent notamment aux séquences promotrices, facultativement aux séquences activatrices et aux signaux de terminaison de la transcription. Facultativement, le gène de sélection peut constituer

30 un gène de fusion avec le gène humain. Ledit gène de fusion est alors lié de manière opérationnelle avec des séquences d'ADN permettant de contrôler l'expression

dudit gène de fusion. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le gène de sélection est situé aux extrémités 5' ou 3' du transgène de sorte que si un événement de recombinaison homologue se produit,  
5 le gène de sélection n'est pas intégré dans l'ADN génomique cellulaire; dans ce cas, le gène de sélection est un gène de sélection négatif (pour revue voir brevet US 5 627 059).

Ledit gène de sélection positive selon l'invention  
10 est de préférence choisi parmi les gènes de résistance aux antibiotiques. Parmi les antibiotiques, il convient de citer de manière non exhaustive la néomycine, la tétracycline, l'ampicilline, la kanamycine, la phléomycine, la bléomycine, l'hygromycine, le  
15 chloramphénicol, la carbénicilline, la généticine, la puromycine. Les gènes de résistance correspondant à ces antibiotiques sont connus de l'homme du métier ; à titre d'exemple, le gène de la néomycine rend les cellules résistantes à la présence de l'antibiotique  
20 G418 dans le milieu de culture. Le gène de sélection positif peut également être sélectionné parmi le gène HisD, l'agent sélectif correspondant étant l'histidinol. Le gène de sélection positif peut également être sélectionné parmi le gène de la guanine-  
25 phosphoribosyl-transférase (GpT), l'agent sélectif correspondant étant la xanthine. Le gène de sélection positif peut également être sélectionné parmi le gène de l'hypoxanthine-phosphoribosyl-transférase (HPRT), l'agent sélectif correspondant étant l'hypoxanthine.

30 Ledit gène de sélection négative selon l'invention est de préférence choisi parmi le gène de la 6-thioxanthine ou thymidine kinase (TK) (Mzoz et al.,

1993), les gènes codant pour des toxines bactériennes ou virales telles par exemple l'exotoxine A de *Pseudomonas*, la toxine diphtérique (DTA), la toxine cholérique, la toxine anthrax de *Bacillus*, la toxine  
5 Pertussis, la toxine Shiga de *Shigella*, la toxine apparentée à la toxine Shiga, les toxines d'*Escherichia coli*, la colicine A, la d-endotoxine. On peut également citer le cytochrome p450 de rat et la cyclophosphamide (Wei et al., 1994), la purine  
10 nucléoside phosphorylase d'*Escherichia coli* (*E. coli*) et la 6-méthylpurine déoxyribonucléoside (Sorscher et al., 1994), les cytosines déaminases (Cdase) ou uracil phosphoribosyl transférase (UPRTase) qui peuvent être utilisées avec la 5-fluorocytosine (5-FC).

15 Le ou les marqueurs de sélection utilisés pour permettre d'identifier les événements de recombinaison homologue peuvent affecter par la suite l'expression génique, et peuvent être éliminés, si nécessaire, par la mise en œuvre de recombinases site-spécifiques telle  
20 la recombinaise Cre spécifique des sites Lox (Sauer, 1994 ; Rajewsky et al., 1996; Sauer, 1998) ou FLP spécifique des sites FRT (Kilby et al., 1993).

Les colonies positives, c'est-à-dire contenant des cellules dans lesquelles au moins un événement de  
25 recombinaison homologue s'est produit sont identifiées par une analyse par southern blotting et/ou par des techniques de PCR. Le taux d'expression, dans les cellules isolées ou les cellules de l'animal transgénique selon l'invention, de l'ARNm correspondant  
30 au transgène peut également être déterminé par des techniques comprenant l'analyse par northern blotting, l'analyse par hybridation *in situ*, par RT-PCR.

Egalement les cellules ou tissus animaux exprimant le transgène peuvent être identifiés en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine rapporteuse. Les cellules positives peuvent ensuite être utilisées pour

5 réaliser les manipulations sur l'embryon et notamment l'injection des cellules modifiées par recombinaison homologue dans les blastocystes. Pour ce qui concerne la souris, les blastocystes sont obtenus à partir de femelles superovulées de 4 à 6 semaines. Les cellules

10 sont trypsinées et les cellules modifiées sont injectées dans le blastocèle d'un blastocyste. Après l'injection, les blastocystes sont introduits dans la corne utérine de femelles pseudo-gestantes. On laisse ensuite les femelles aller jusqu'à leur terme et les

15 portées résultantes sont analysées pour déterminer la présence de cellules mutantes possédant la construction. L'analyse d'un phénotype différent entre les cellules de l'embryon nouveau-né et les cellules du blastocyste ou des cellules ES permet de détecter les

20 nouveau-nés chimériques. Les embryons chimériques sont ensuite élevés jusqu'à l'âge adulte. Les chimères ou animaux chimériques, sont des animaux dans lesquels seule une sous-population de cellules possède un génome altéré. Les animaux chimériques présentant le gène ou

25 les gènes modifiés, sont en général croisés entre eux ou avec un animal de type sauvage afin d'obtenir une descendance hétérozygote ou homozygote. Les hétérozygotes mâles et femelles sont ensuite croisés pour générer des animaux homozygotes. A moins qu'il ne

30 soit indiqué, l'animal transgénique selon l'invention comprend des changements stables de la séquence nucléotidique des cellules de la lignée germinale.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la cellule transgénique non humaine selon l'invention peut servir de cellule donneuse de noyau dans le cadre d'un transfert de noyau ou transfert nucléaire. Par 5 transfert nucléaire, on entend désigner le transfert de noyau d'une cellule vivante donneuse de vertébré, d'un organisme adulte ou au stade fœtal, dans le cytoplasme d'une cellule receveuse énucléée de la même espèce ou d'une espèce différente. Le noyau transféré est 10 reprogrammé pour diriger le développement des embryons clonés qui peuvent ensuite être transférés dans des femelles porteuses pour produire les fœtus et les nouveau-nés, ou utilisés pour produire des cellules de la masse cellulaire interne en culture. Différentes 15 techniques de clonage nucléaire sont susceptibles d'être utilisées ; parmi celles-ci, il convient de citer de manière non exhaustive celles qui font l'objet des demandes de brevet WO 95 17500, WO 97 07668, WO 97 07669, WO 98 30683, WO 99 01163, WO 99 37143.

20 Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le ciblage génique selon la présente invention constitue un « Knock-In » (K-I). Le transgène ou le gène exogène ou la séquence nucléotidique selon l'invention codant pour au moins tout ou partie d'un 25 polypeptide humain impliqué dans la reconnaissance et/ou dans l'activation antigénique des cellules T selon l'invention est ciblée par recombinaison homologue dans le génome de l'organisme. Selon un mode préféré de réalisation, la séquence nucléotidique est 30 intégrée de manière stable dans le génome de ladite cellule par insertion ciblée par recombinaison homologue (« Knock-In ») au niveau d'au moins un allèle

dudit gène animal, et son intégration invalide ledit gène animal endogène homologue.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, le transgène ou la séquence nucléotidique est dépourvu d'éléments de régulation de l'expression génique et est lié de manière opérationnelle à des séquences de régulation de l'expression dudit gène animal endogène homologue.

Selon un second mode de réalisation de l'invention, le transgène ou la séquence nucléotidique comprend des éléments de régulation de l'expression génique et est lié de manière opérationnelle à des séquences exogènes de régulation de l'expression. Selon un mode préféré de réalisation, les dites séquences de régulation de l'expression exogènes sont les séquences de régulation de l'expression du dit gène humain codant pour le polypeptide humain.

Le transgène comprend au moins un gène, humain, qui code pour le polypeptide humain impliqué dans la reconnaissance antigénique et/ou dans l'activation cellulaire des cellules T. Ledit gène humain comprend soit l'ensemble des séquences contenant l'information pour la production régulée de l'ARN correspondant (transcription) soit de la chaîne polypeptidique correspondante (transcription-traduction). Ledit gène humain peut être un gène de type "sauvage" présentant un polymorphisme naturel ou une séquence d'ADN manipulée génétiquement, par exemple ayant des délétions, substitutions ou insertions dans les régions codantes ou non codantes. De manière préférée, le ou les gènes humain(s) sont dépourvus de séquences de régulation nécessaires pour diriger et contrôler leur

expression dans un ou des type(s) cellulaire(s) approprié(s) ; en effet, ils sont placés après recombinaison homologue sous le contrôle des séquences animales endogènes de régulation de l'expression du  
5 gène endogène animal cible qui demeure de préférence actif suite à l'événement de recombinaison homologue et l'intégration du gène humain.

Alternativement, le transgène selon l'invention peut contenir des séquences de régulation appropriées  
10 pour diriger et contrôler l'expression dudit ou desdits protéines humaines impliquées dans la reconnaissance et/ou dans l'activation antigénique par les cellules T dans la cellule. Dans ce cas, le transgène est intégré de manière ciblée ou aléatoire dans le génome, ou est  
15 présent sous forme épisomale dans la cellule. Dans ce cas de figure, les séquences de régulation appropriées sont des séquences inductibles par une ou plusieurs protéines.

Par éléments de régulation de l'expression du gène,  
20 on entend désigner toutes les séquences d'ADN impliquées dans la régulation de l'expression génique c'est-à-dire essentiellement les séquences régulatrices de la transcription, de l'épissage, de la traduction. Parmi les séquences d'ADN régulatrices de la  
25 transcription, il convient de citer la séquence promotrice minimale, les séquences amonts (par exemple, la boîte SP1, l'IRE pour « interferon responsive element »,...), les séquences activatrices (« enhancers »), éventuellement les séquences  
30 inhibitrices (« silencers »), les séquences insulateurs (« insulator »), les séquences d'épissage.

Ces séquences de régulation de l'expression sont liées de manière opérationnelle au(x) gène(s) humain(s). Une séquence nucléique est « liée de manière opérationnelle » lorsqu'elle est placée dans une relation fonctionnelle avec une autre séquence d'acide nucléique. Par exemple, un promoteur ou un activateur (« enhancer ») est lié de manière opérationnelle à une séquence codante, s'il affecte la transcription de ladite séquence codante. Concernant les séquences régulatrices de la transcription, « lié de manière opérationnelle » signifie que les séquences d'ADN liées sont contiguës, et lorsqu'il s'agit de lier deux régions codantes pour des protéines, contiguës et en phase de lecture.

La cellule transgénique et/ou l'animal transgénique non humain selon l'invention est obtenu en introduisant au moins un transgène codant pour un polypeptide humain impliqué dans la reconnaissance antigénique et/ou dans l'activation cellulaire des cellules T, dans une cellule, un zygote ou un embryon précoce de l'animal non humain. L'introduction de différents transgènes dans la cellule selon l'invention peut également être réalisée de manière simultanée ou de manière décalée dans le temps. Lorsque la cellule contient plusieurs transgènes, elle peut être obtenue directement par introduction simultanée des fragments d'ADN nécessaires à la recombinaison homologue dans ladite cellule en utilisant des méthodes favorisant la co-transformation de molécules d'ADN multiples. Les cellules sont alors sélectionnées pour les multiples événements de recombinaison attendus en utilisant un système de sélection adapté. Alternativement, la cellule multi-



transgénique peut être obtenue en réalisant les événements de recombinaison homologue séparément et de manière décalée dans le temps. Ainsi, la cellule, après introduction d'un premier vecteur de recombinaison  
5 homologue, est sélectionnée pour le premier événement de recombinaison homologue, en utilisant un système de sélection adaptée ; cette cellule nouvellement transgénique est ensuite transformée avec un second vecteur de recombinaison homologue, puis sélectionnée  
10 pour le second événement de recombinaison homologue en utilisant un système de sélection identique ou différent. Facultativement, cette cellule double transgénique peut ensuite être transformée avec un troisième vecteur de recombinaison homologue, puis  
15 sélectionnée pour le troisième événement de recombinaison homologue en utilisant un système de sélection identique ou différent, et ainsi de suite. Alternativement, la cellule double, triple ou multi-transgénique selon l'invention peut être obtenue par  
20 croisement successif d'animaux transgéniques. Par exemple, une cellule double transgénique peut être obtenue par croisement de deux animaux simples transgéniques homozygotes ; elle peut être obtenue par croisement puis sélection de deux animaux simples  
25 transgéniques hétérozygotes, ou par croisement et sélection d'un animal simple transgénique homozygote et d'un animal simple transgénique hétérozygote.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la cellule selon l'invention se caractérise en ce  
30 qu'elle comprend en outre au moins un transgène comprenant au moins tout ou partie d'une séquence nucléotidique codant pour au moins tout ou partie d'un

polypeptide humain impliqué dans la reconnaissance antigénique et/ou l'activation cellulaire des cellules T présent sous forme épisomale dans la dite cellule, et en ce que le dit gène animal endogène homologue est  
5 invalidé dans la dite cellule. De préférence, le dit gène animal endogène homologue est invalidé par recombinaison homologue ciblée (« knock-out »). Il est à la portée de l'homme du métier de définir la nature et les caractéristiques du vecteur d'expression utilisé  
10 pour permettre le maintien et l'expression sous forme épisomale du transgène dans la cellule de l'invention.

Alternativement, la cellule selon l'invention se caractérise en ce qu'elle comprend en outre au moins un transgène comprenant au moins tout ou partie d'une  
15 séquence nucléotidique codant pour au moins tout ou partie d'un polypeptide humain impliqué dans la reconnaissance antigénique et/ou l'activation cellulaire des cellules T intégré de manière aléatoire dans le génome ; dans ce cas, le transgène est de  
20 préférence intégré dans une région non codante du génome, sous la dépendance d'éléments de réponse à des protéines impliquées dans la reconnaissance et/ou l'activation antigénique par les cellules T.

Selon un premier mode de réalisation de  
25 l'invention, la cellule selon l'invention est caractérisée en ce que la ou lesdites séquences nucléotidiques codent pour tout ou partie d'un antigène HLA de classe I humain et est ou sont insérées par insertion ciblée par recombinaison homologue (« Knock-  
30 In ») au niveau du ou des gènes animaux homologues codant le ou les antigènes animaux du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I).

Selon un autre mode de réalisation, la cellule selon l'invention est caractérisée en ce que la ou lesdites séquences nucléotidiques codent pour tout ou partie des molécules HLA de classe II et est ou sont  
5 insérées par insertion ciblée par recombinaison homologue (« Knock-In ») au niveau du ou des gènes animaux homologues codant les antigènes animaux du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II).

10 Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la cellule selon l'invention se caractérise en ce que la ou lesdites séquences nucléotidiques codent pour tout ou partie des molécules HLA de classe I et de classe II et est ou sont insérées par insertion ciblée  
15 par recombinaison homologue (« Knock-In ») au niveau du ou des gènes animaux homologues codant le ou les antigènes animaux du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) et de classe II (CMH II).

20 Le dit antigène HLA de classe I humain est choisi dans le groupe composé de HLA-A2, HLA-A24, HLA-A1, HLA-A3, HLA-B7, HLA-B27, HLA-B44, HLA-B8, HLA-B35, HLA-Cw7, HLA-Cw3, et ledit antigène animal du CMH I est choisi parmi H2K, H2D et H2L. Ledit antigène HLA de classe II  
25 humain est choisi dans le groupe composé de HLA-DR4, HLA-DR1, HLA-DR11, HLA-DR7, HLA-DR2, HLA-DR3, HLA-DQ8, HLA-DQ3, HLA-DP4, et ledit antigène animal du CMH II est choisi parmi I-A alpha, I-A bêta, I-E alpha et I-E bêta.

30 Selon un autre mode de réalisation, la cellule selon l'invention se caractérise en ce que ladite séquence nucléotidique code pour tout ou partie de la

$\beta$ 2-microglobuline humaine, et est insérée par insertion ciblée par recombinaison homologue (« Knock-In ») au niveau du gène animal homologue codant la  $\beta$ 2-microglobuline.

- 5        Selon un autre mode de réalisation, la cellule selon l'invention se caractérise en ce que la ou lesdites séquences nucléotidiques codent pour tout ou partie d'au moins une des polypeptides du complexe CD3 humain et est ou sont insérées par insertion ciblée par  
10 recombinaison homologue (« Knock-In ») au niveau du ou des gènes animaux homologues codant pour le ou les polypeptides du complexe CD3.

      Selon un autre mode de réalisation, la cellule selon l'invention se caractérise en ce que ladite  
15 séquence nucléotidique code pour tout ou partie du polypeptide CD4 humain et est insérée par insertion ciblée par recombinaison homologue (« Knock-In ») au niveau du gène animal homologue codant pour le polypeptide CD4.

- 20        Selon un autre mode de réalisation, la cellule selon l'invention se caractérise en ce que ladite séquence nucléotidique code pour tout ou partie du polypeptide CD8 humain et est insérée par insertion ciblée par recombinaison homologue (« Knock-In ») au  
25 niveau du gène animal homologue codant pour le polypeptide CD8.

      Selon un autre mode de réalisation, la cellule selon l'invention se caractérise en ce qu'elle comporte  
(a) ladite séquence nucléotidique codant pour tout ou  
30 partie de la  $\beta$ 2-microglobuline humaine, insérée par insertion ciblée par recombinaison homologue (« Knock-

In ») au niveau du gène animal homologue codant la  $\beta 2$ -microglobuline ; et/ou (b) ladite séquence nucléotidique codant pour tout ou partie du polypeptide CD4 humain, insérée par insertion ciblée par recombinaison homologue (« Knock-In ») au niveau du gène animal homologue codant pour le polypeptide CD4 ; et/ou (c) ladite séquence nucléotidique codant pour tout ou partie du polypeptide CD8 humain, insérée par insertion ciblée par recombinaison homologue (« Knock-In ») au niveau du gène animal homologue codant pour le polypeptide CD8. Selon un mode préféré de réalisation, seule la partie extracellulaire des polypeptides CD4 et CD8 est humanisée. Optionnellement, la cellule selon l'invention comporte en outre la ou lesdites séquences nucléotidiques codant pour tout ou partie d'au moins une des polypeptides du complexe CD3 humain, insérées par insertion ciblée par recombinaison homologue (« Knock-In ») au niveau du ou des gènes animaux homologues codant pour le ou les polypeptides du complexe CD3.

La présente invention porte également sur l'animal transgénique non-humain comprenant au moins une cellule selon l'invention. Par « animal transgénique », on entend désigner un animal non humain, de préférence un mammifère choisi dans le groupe des rongeurs et notamment de la souris, du rat, du hamster, du cobaye. La souris est particulièrement appréciée car son système immunitaire a été étudié en profondeur. Alternativement, l'animal transgénique est choisi parmi les animaux d'élevage et notamment les porcins, ovins, caprins, bovins, équidés, notamment le cheval, les lagomorphes, notamment le lapin. L'animal transgénique

selon l'invention peut également être choisi parmi les primates, notamment les singes, tels le macaque, le chimpanzé, le babouin.

Compte tenu des polymorphismes génétiques présents  
5 dans la population, il peut être intéressant pour analyser ou obtenir une réponse physiologique ou comportementale caractéristique que les animaux transgéniques selon l'invention, et notamment les souris transgéniques selon l'invention présentent des  
10 fonds génétiques différents. Ainsi, les souris selon l'invention peuvent être sélectionnées dans les lignées murines consanguines (« inbred ») 129Sv, 1290la, C57Bl6, BalB/C, DBA/2, mais également dans les lignées non consanguines (« outbred ») ou des lignées hybrides.

15 L'animal transgénique selon l'invention comprend au moins une cellule dont le génome comprend au moins un transgène ou séquence nucléotidique selon l'invention intégrée par insertion ciblée (« knock-in »), et facultativement au moins un transgène ou séquence  
20 nucléotidique présent soit sous forme d'élément extra-chromosomal, soit intégré de manière aléatoire dans l'ADN chromosomique. De préférence, l'ensemble des transgènes selon l'invention sont intégrés par recombinaison homologue ciblée (« Knock-In ») dans le  
25 génome de la cellule selon l'invention. De préférence, l'ensemble des cellules de l'animal et notamment ses cellules de la lignée germinale sont transgéniques.

L'animal transgénique selon l'invention se caractérise en ce que les cellules de son système  
30 immunitaire expriment au moins un antigène HLA humain fonctionnel ; les cellules de son système immunitaire

peuvent exprimer en outre des molécules co-réceptrices et co-stimulatrices humanisées et fonctionnelles.

L'invention vise également l'utilisation d'une cellule et ou d'un animal selon l'invention pour le  
5 criblage de composés modulant la réponse immune humaine. C'est donc un objet de l'invention de fournir un procédé de criblage de composés modulant, c'est-à-dire induisant, stimulant, inhibant, annihilant une réaction immune chez l'homme, caractérisé en ce qu'il  
10 comprend les étapes de (a) la mise en contact d'une cellule et/ou d'un animal selon l'invention avec un immunogène responsable du déclenchement d'une réponse immune, (b) la mise en contact d'une cellule et/ou d'un animal selon l'invention avec un immunogène responsable  
15 du déclenchement d'une réponse immune et, de manière simultanée ou décalée dans le temps, avec ledit composé, (c) la détermination et évaluation qualitative, facultativement quantitative, si une réaction immune se produit, (d) puis l'identification  
20 du composé qui module sélectivement la réaction immune.

Selon un mode de réalisation, la détermination et/ou l'évaluation de ladite réaction immune est réalisée selon une technique choisie parmi (a) la détermination de la production de facteurs solubles  
25 tels que les chimiokines et les cytokines, (b) la détermination de la présence de récepteurs à la surface cellulaire, (c) la détermination de la prolifération cellulaire, (d) la détermination des fonctions effectrices des cellules T (CTL, Helper...), (e) la  
30 détermination de la production d'anticorps par les cellules B.

Alternativement, ladite détermination et/ou l'évaluation de ladite réaction immune est réalisée par la mesure du taux d'expression d'un gène rapporteur. Au sens de la présente invention, on entend désigner par

5 gène rapporteur, un gène qui permet aux cellules comportant ce gène d'être détectées de manière spécifique suite à l'expression de ce dernier, c'est-à-dire d'être distinguées des autres cellules qui ne portent pas ce gène marqueur. Ledit gène rapporteur

10 selon l'invention code pour une protéine rapporteuse choisie de préférence dans le groupe composé des protéines auto-fluorescentes, telles que la protéine de fluorescence verte (GFP, pour « *Green Fluorescence Protein* »), la protéine de fluorescence verte augmentée

15 (EGFP), la protéine de fluorescence jaune (YFP pour « *Yellow Fluorescence Protein* »), la protéine de fluorescence bleue (CFP, pour « *Cyan fluorescence protein* »), la protéine de fluorescence rouge (RFP pour « *Red Fluorescence Protein* »), ainsi que les variants

20 de ces protéines de fluorescence obtenues par mutagenèse pour générer une fluorescence de couleur différente. Ledit gène « reporter » code également pour toute enzyme détectable de manière fluorescente, phosphorescente, ou visible par un procédé

25 histochimique sur des cellules vivantes ou toutes autres méthodes d'analyse cellulaire, ou par microscopie. De façon non exhaustive, il convient de citer la  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -GAL), la  $\beta$ -glucoronidase ( $\beta$ -GUS), la phosphatase alcaline, notamment la

30 phosphatase alcaline placentaire (PLAP), la déshydrogénase alcoolique, notamment la déshydrogénase



alcoolique de drosophile (ADH), la luciférase, notamment la « Firefly Luciferase », la chloramphénicol-acétyl-transférase (CAT), l'hormone de croissance (GH).

- 5 Enfin, l'invention porte également sur l'utilisation d'une composition comprenant un composé modulant la réaction immune et un véhicule pharmaceutiquement acceptable à titre de médicament pour le traitement préventif et/ou curatif d'un homme
- 10 ou d'un animal nécessitant un tel traitement, caractérisé en ce que l'aptitude dudit composé à moduler, c'est-à-dire à inhiber, à activer, à annihiler sélectivement la réponse immune est déterminée par (a) la mise en contact d'une cellule et/ou d'un animal
- 15 selon l'invention avec un immunogène responsable du déclenchement d'une réponse immune, (b) la mise en contact d'une cellule et/ou d'un animal selon l'invention avec un immunogène responsable du déclenchement d'une réponse immune et, de manière
- 20 simultanée ou décalée dans le temps, avec ledit composé, (c) la détermination et évaluation qualitative, facultativement quantitative, si une réaction immune se produit, (d) puis l'identification du composé qui module sélectivement la réaction immune.
- 25 Par antigène au sens de la présente invention, on entend désigner un composé capable de déclencher une réponse immune et/ou d'être reconnu par un anticorps ou un lymphocyte T. Par immunogène, on entend désigner un composé capable de déclencher une réponse immune. Parmi
- 30 les antigènes qui réagissent avec les récepteurs des cellules T ou avec tous autres types de récepteurs exprimés sur les cellules impliquées dans la mise en

place et le développement d'une réponse immune innée ou spécifique, on peut citer les allergènes, les mitogènes, les agents pathogènes, ou l'un de leurs constituants, d'origine virale, bactérienne, parasitaire, fongique, mycoplasémique, les vaccins et compositions vaccinales, les adjuvants, les médicaments, les composés ou agents chimiques. La mise en contact d'un antigène spécifique avec une cellule ou un animal selon l'invention peut se faire par diverses voies telles par exemple une infection classique par un microorganisme pathogène, ou via un vecteur biologique de délivrance (moustique, tique, bactérie, virus et parasites ou agent commensale recombinant, ADN nu...), par inhalation, en aérosol, par la nourriture.

Expérimentalement, l'immunogène peut être mis en contact avec l'animal par une administration par voie systémique, en particulier par voie intraveineuse, par voie intramusculaire, intradermique, contact cutané ou par voie orale.

Les composés obtenus par les procédés de criblage de l'invention et qui induisent une réaction immune chez l'homme constituent d'excellent vaccins. Ces composés ainsi identifiés peuvent être par exemple des vaccins à épitope minimal pour des maladies d'origine virale telles que le syndrome d'immunodéficience humaine (SIDA) provoquée par une infection par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), l'hépatite B, l'hépatite C, pour des maladies d'origine bactériennes telles la tuberculose, ou d'origine parasitaire telle que la malaria.

Le composé obtenu par le procédé de criblage selon l'invention ou la composition selon l'invention peut

être utilisée non seulement dans un traitement préventif, mais également dans un traitement curatif d'un certain nombre de pathologies pour lesquelles existent un dysfonctionnement de la reconnaissance antigénique et/ou de l'activation cellulaire des cellules T. C'est le cas notamment dans le contexte d'une infection bactérienne, virale, fongique ou parasitaire ou dans le cas de l'établissement d'un cancer et de maladies auto-immunes. Parmi les maladies auto-immunes, il convient de citer de manière non exhaustive l'uvéite, la maladie de Bechet, la Sarcoïdose, le syndrome de Sjögren, la polyarthrite rhumatoïde, la polyarthrite juvénile, le syndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter, la goutte, l'ostéoartrrose, le lupus érythémateux aigu disséminé, la polymyosite, la myocardite, la cirrhose biliaire primitive, la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse, la sclérose en plaques et autres maladies démyélinisantes, l'anémie aplasique, le purpura thrombocytopénique essentiel, le myélome multiple et le lymphome à lymphocytes B, le panhypopituitarisme de Simmonds, la maladie de Basedow-Graves et l'ophtalmopathie de Graves, la thyroïdite subaiguë et la maladie de Hashimoto, la maladie d'Addison et le diabète sucré insulino-dépendant (type 1).

Par véhicule pharmaceutiquement acceptable, on entend désigner tout type de véhicule employé habituellement dans la préparation de compositions pharmaceutiques et vaccinales, c'est-à-dire un diluant, vecteur synthétique ou biologique, un agent de suspension telle une solution saline isotonique ou tamponnée. De préférence, ces composés seront

administrés par voie systémique, en particulier par  
voie intraveineuse, par voie intramusculaire,  
intradermique ou par voie orale. Leurs modes  
d'administration, posologies et formes galéniques  
5 optimaux peuvent être déterminés selon les critères  
généralement pris en compte dans l'établissement d'un  
traitement adapté à un patient comme par exemple l'âge  
ou le poids corporel du patient, la gravité de son état  
général, la tolérance au traitement et les effets  
10 secondaires constatés, etc. Quand l'agent est un  
polypeptide, un antagoniste, un ligand, un  
polynucléotide, par exemple une composition antisens,  
un vecteur, par exemple un vecteur antisens, on peut  
l'introduire dans des tissus ou des cellules hôtes par  
15 un certain nombre de façons, incluant l'infection  
virale, la micro-injection ou la fusion de vésicules.  
On peut également utiliser l'injection par jet pour une  
administration intramusculaire.

L'invention concerne l'utilisation d'une cellule ou  
20 d'un animal selon l'invention à des fins de recherches  
expérimentales pour l'analyse, l'étude et la  
modélisation des mécanismes moléculaires, biologiques,  
biochimiques, physiologiques et/ou physiopathologiques  
de la réaction immune chez l'homme et notamment de la  
25 reconnaissance antigénique et/ou de l'activation  
cellulaire des cellules T. En fonction du type de  
recherche que l'on veut développer, on utilise soit  
l'animal entier, soit des cellules dérivées dudit  
animal. Ces cellules peuvent être soit isolées  
30 fraîchement de l'animal ou peuvent être immortalisées  
en culture, soit en multipliant les passages, soit en  
transformant les cellules par des virus tels le virus

SV40 ou le virus d'Epstein-Bahr. Ainsi, les cellules et les animaux selon l'invention sont particulièrement utiles pour étudier les bases moléculaires nécessaires à la mise en place et au développement de maladies auto-immunes, des phénomènes allergiques ou inflammatoires, des rejets de greffes.

L'invention concerne l'utilisation d'une cellule ou d'un animal selon l'invention pour le criblage de composés biologiques ou chimiques thérapeutiquement actifs, notamment de composés modulant la réponse immune humaine.

L'invention concerne également l'utilisation d'une cellule génétiquement modifiée ex vivo selon l'invention pour la préparation d'une greffe cellulaire et ou tissulaire pour le traitement préventif et curatif d'un homme ou d'un animal nécessitant un tel traitement, caractérisée en ce que, lorsqu'un hôte allogénique est transplanté avec ladite cellule, celle-ci est moins fortement rejetée ou tolérée qu'une même cellule n'ayant pas été génétiquement modifiée, par le système immunitaire dudit hôte. De préférence, ladite cellule est une cellule de souris, de porc, de bovin, de primate. De manière préférée il s'agit d'une cellule de porc. De telles cellules sont susceptibles de constituer des cellules donneuses universelles et/ou personnalisées par la nature des molécules HLA humaines exprimées. Les cellules particulièrement intéressantes sont les cellules de Langerhans, les cellules de la medulla surrénale qui peuvent sécréter de la dopamine, les ostéoblastes, les ostéoclastes, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les lymphocytes T, les neurones, les cellules gliales, les

cellules ganglionnaires, les cellules rénales, les cellules de la rétine, les cellules souches embryonnaires, les cellules hépatiques, les cellules de la moelle osseuse et les myoblastes. Ladite cellule  
5 exprime en outre au moins une protéine destinée au traitement préventif et curatif d'un homme ou d'un animal nécessitant un tel traitement, ladite protéine étant sélectionnée de préférence dans le groupe composé des cytokines, des interleukines, des chimiokines, des  
10 facteurs de croissance, des hormones, des anticorps. Ainsi pour le traitement du cancer, il peut être intéressant de greffer à un patient atteint de cancer des cellules selon l'invention exprimant de l'interleukine 2 (IL2) ou du GM-CSF (« *granulocytes-*  
15 *macrophages colonies stimulating factor* »). Ainsi pour le traitement du diabète, il peut être intéressant de greffer à un patient atteint de diabète des cellules selon l'invention exprimant de l'insuline.

20 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description avec les exemples représentés ci-après.

EXEMPLESMATERIEL ET METHODESVecteurs

- 5        Le gène codant pour la bêta 2 microglobuline chez la souris est composé de 4 exons, l'exon 2 codant pour la quasi totalité de la protéine. Son humanisation est réalisée par knock-in du second exon codant pour la protéine humaine en lieu et place du second exon murin.
- 10       Le vecteur de recombinaison homologue correspond à un fragment d'ADN génomique au niveau du gène de la bêta 2 microglobuline murin dans lequel l'exon 2 est remplacé par son homologue humain par digestion enzymatique au niveau de sites introniques.
- 15       La molécule CD8 est un hétérodimère formé d'une sous-unité alpha et une sous-unité bêta. Les deux gènes codant pour ces protéines sont situés sur une région de 60 Kb. Cette proximité oblige les inventeurs à réaliser de manière impérative les knock-in de ces gènes sur le
- 20 même clone de cellules ES et de vérifier que les deux recombinaisons homologues ont eu lieu sur le même chromosome par FISH (« Fluorescent In Situ Hybridization ») avec des sondes spécifiques de chacune des constructions ou par toutes autres méthodes
- 25 discriminatives (par exemple, ségrégation chromosomique).

Les deux gènes CD8 alpha et CD8 bêta sont invalidés par insertion ciblée dans le premier exon codant d'une molécule d'ADNc chimère comprenant la partie

30 extracytoplasmique humaine associée à une séquence ADNc codant pour les parties transmembranaires et intracytoplasmiques de la molécule murine. Les deux recombinaisons homologues sont réalisées en même temps

par co-électroporation des deux vecteurs et ce pour éviter deux étapes successives de recombinaison homologues.

Pour l'ensemble de ces vecteurs, les cassettes de  
5 sélection sont flanquées de recombinaisons sites-spécifiques, permettant leur élimination une fois l'événement de recombinaison homologue sélectionné.

En ce qui concerne les gènes murins codant pour les molécules du CMH de classe I chez la souris, H2-K est  
10 invalidé par délétion des exons 1 et 2. Le gène H2-D est invalidé par insertion d'une cassette de sélection flanquée de sites spécifiques de la recombinaison Cre de manière à effectuer un échange. L'insertion d'un ou plusieurs gènes HLA choisis, dans le locus H2-D, est  
15 réalisée par simple échange de cassette contenant l'ADNc humain. Dans un premier temps, les inventeurs ont introduit l'ADNc de la molécule HLA-A1.

#### **Culture, électroporation et sélection des cellules 20 souches embryonnaires**

Les cellules ES de fond génétique 129Sv/J ou C57BL/6J sont cultivées sur couches de cellules nourricières (fibroblastes embryonnaires de souris  
25 MEFs) comme décrit précédemment (Fraichard et al., 1997).

Les cellules ES sont trypsinées, lavées et resuspendues à une concentration de  $6,25 \cdot 10^6$  ES/ml dans du milieu de culture sans sérum et électroporées en  
30 présence de 25 à 50 µg/ml vecteur d'homologie linéarisé. Un voltage de 260V associé à une capacitance



de 500 $\mu$ F est optimal pour une cuve d'électroporation de 4 mm d'épaisseur.

1x10<sup>6</sup> à 5x10<sup>6</sup> cellules ES électroporées sont ensuite ensemencés sur MEFs Néo résistants irradiés. 36 heures  
5 après mise en culture des cellules ES électroporées, la sélection des clones résistants commence par ajout de généticine (G418 à 250  $\mu$ g/ml) dans le milieu de culture.

Pour la co-électroporation, un mélange équimolaire  
10 des deux vecteurs de recombinaison homologue sont électroporés dans les mêmes conditions.

#### **Analyse des clones antibiotiques résistants par criblage par PCR et Southern blot**

15 Les clones de cellules ES visibles 10 à 12 jours de culture en présence de G418 sont prélevés.

Les trois quarts des cellules restantes sont mis en culture sur couches de cellules nourricières en plaques 96 puits. Le quart restant est manipulé en plaques 96  
20 puits, ce qui permet l'analyse simultanée de 80 clones. Les cellules ES sont resuspendues par ajout de 10  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O stérile. Après choc thermique pour éclater les cellules (2 minutes à 65°C), 4  $\mu$ l sont utilisés pour la réaction de PCR. Les clones recombinants isolés par PCR  
25 sont confirmés par Southern blot.

#### **Production de souris chimères par injection de cellules ES dans des blastocystes**

30 Les blastocystes sont isolés à partir de femelles donneuses C57BL/6J (Charles River Iffa Credo) 3,5 jours

après fécondation. Les blastocystes sont récupérés par rinçage des cornes utérines avec 1 ml milieu M2. Quelques blastocystes sont déposés dans la chambre d'injection, dans une goutte de M2 recouverte d'huile minérale. 3 à 5 cellules ES sont injectées dans le blastocœle. 4 heures après l'injection, 5 à 9 blastocystes sont réimplantés dans chacune des cornes utérines de femelles pseudogestantes accouplées avec un mâle vasectomisé 2,5 jours auparavant.

10 Les cellules ES de fond génétique 129Sv/J ainsi que toutes les souris dérivées de ces cellules ES portent les marqueurs caractéristiques de la souche c'est-à-dire homozygote pour le locus agouti A/A donnant une fourrure de couleur agouti. La contribution des  
15 cellules ES au développement de l'embryon hôte C57BL/6J (non-agouti) peut être rapidement évaluée au niveau du pelage. En effet, si les cellules ES injectées ont participé au développement embryonnaire présentent les souris obtenues présentent un pelage chimère agouti et  
20 noir très facilement identifiable des petits entièrement noirs issus d'embryons hôtes non colonisés par les cellules ES. Suivant le même principe, les cellules ES C57BL/6J (noir) recombinantes sont injectés dans des blastocystes de fond génétiques BALB/c  
25 (albino).

#### **Génération d'animaux hétérozygotes**

Les mâles présentant un fort taux de chimérisme sont mis en accouplement avec des femelles C57BL/6J.

30 Pour les chimères obtenues par injection de cellules ES C57BL/6 sont également mise en accouplement avec des femelles C57BL/6J. Dans ce cas, l'ensemble de

la première génération est criblé par PCR pour l'événement de recombinaison homologue. Les animaux hétérozygotes positifs par PCR sont systématiquement confirmés par Southern blot.

- 5 L'ADN pour le géotypage des descendants est obtenu à partir de biopsies de queue de souris.

#### Génération d'animaux homozygotes

- 10 Mâles et femelles hétérozygotes sont mis en accouplement, les portées sont analysées pour la présence de deux allèles recombinants. Comme attendu, un quart de la descendance sont homozygotes. Ces animaux représentent alors une nouvelle lignée de souris transgéniques.

- 15 Des souris transgéniques exprimant des polypeptides humains impliqués dans la reconnaissance et/ou l'activation antigénique par les cellules T seront produites de façon indépendante. Les homozygotes et/ou hétérozygotes pour chaque type de transgénique seront  
20 ensuite croisés et la descendance sera testée afin de sélectionner les animaux exprimant les deux transgéniques.

- Le fond génétique des animaux transgéniques pourra également être changé par croisements successifs avec  
25 des animaux d'un autre fond génétique que celui utilisé initialement.

REFERENCES

- Barzaga-Gilbert et al. (1992) J. Exp. Med. 175:1707-1715.
- Bradding et al. (1992) J. Exp. Med. 176:1381.
- 5 Capecchi (1989) Science 244:1288.
- Costa et al. (2000) J. Immunol. 164:3581.
- Dalton et al. (1993) Science 259:1739.
- Del Prete et al. (1991) J.Clin.Invest. 88:346
- Farrar (1993) Annu. Rev. Immunol. 11:571.
- 10 Firestein et al. (1989) J.Imm. 143:518.
- Fraichard et al. (1997) EMBO J. 14:4412-20.
- Gordon et al. (1989) Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol. 115:171.
- Gray (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:5842.
- 15 Gross et Paul (1993) J. Immunol. 150:2112.
- Groux et al. (1997) Nature 339:152.
- Hu-Li J. et al. (2001) Immunity 14:1-11.
- Ito et al. (1996) J. Exp.Med. 183 :2635-2644.
- Keon et al. (1990) Methods and Enzymology 185:527.
- 20 Kilby et al. (1993) TIG 9:413.
- Kopf et al. (1993) Nature 362:245.
- Kuhn et Muller (1991) Science 254:707.
- Lavitrano et al. (1989) Cell 57:717.
- Lee et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2061.
- 25 Li-Weber et al. (1997) Immunobiology 198:170.
- Liu et al. (2000) Anal. Biochem. 280:20.
- Lo (1983) Mol. Cell. Biol. 3:1803
- Mansour et al. (1989) Ann. Res. Genet. 23:199.
- 30 Metwali et al. (1996) J. Immunol. 157:4546.
- Mosmann et al. (1986) J. Immunol. 136:2348.

- Mosmann *et al.* (1989) *Ann. Rev. Immunol.* 7:145.  
Mosmann (1996) *Immunol. Today* 17:138.  
Mountford (1995) *Trends In Genetics* 11:179.  
Mzoz *et al.* (1993) *Human Gene Ther.* 4:589.  
5 Neddleman *et al.* (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443  
Noben-Trauth *et al.* (1996) *Transgenic Res.* 5:487.  
Otsuka *et al.* (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:333.  
Ouyang *et al.* (2000) *Immunity* 12:27.  
Pascolo *et al.* (1997) *J. Exp. Med.* 185:2043-2051.  
10 Pearson *et al.* (1988) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85:  
2444.  
Ranganath *et al.* (1998) *J. Immunol.* 161:3822.  
Robinson *et al.* (1993) *J. Imm.* 143:518.  
Romagnani (1999) *Inflamm. Bowel Dis.* 5:285.  
15 Sambrook *et al.* (1989) *Molecular cloning : a  
laboratory manual second edition - Cold Spring  
Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.  
USA*  
Sauer (1994) *Current opinion in Biotechnology* 5:  
20 521.  
Sauer B. (1998) *Methods* 14:81-392.  
Sideras *et al.* (1987) *Adv. Exp. Med. Biol.* 213:227.  
Smith *et al.* (1981) *Ad. App. Math.* 2:482  
Sorscher *et al.* (1994) *Gene Therapy* 1:223-238.  
25 Swain *et al.* (1990) *J. Immunol.* 145:3796.  
Szabo *et al.* (2000) *Cell* 100:655.  
Thompson *et al.* (1989) *Cell* 56:313.  
Van der putten *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad.  
Sci.USA* 82:6148.  
30 Wei *et al.* (1994) *Human Gene Ther.* 5:969-978.  
Wiernenga *et al.* (1990) *J. Imm.* 144:4651.

Yamamura et al. (1991) Science 254:77.

Zheng (1997) Cell 89:587.

Zhu et Grace (1999) Cytometry 37:51.

REVENDICATIONS

1. Cellule animale, isolée, comprenant au moins un transgène comprenant au moins une séquence  
5 nucléotidique codant au moins pour tout ou partie d'un polypeptide humain impliqué dans la reconnaissance antigénique et/ou dans l'activation cellulaire des cellules T, caractérisée en ce que ladite cellule, ou une descendante de ladite cellule, exprime au moins  
10 tout ou partie du ou desdits polypeptide(s) humain(s), et caractérisée en ce que ladite séquence nucléotidique est intégrée de manière stable dans le génome de ladite cellule par insertion ciblée par recombinaison homologue (« Knock-In ») au niveau d'au moins un allèle  
15 dudit gène animal endogène, l'intégration de ladite séquence invalidant ledit gène animal endogène homologue.

2. Cellule selon la revendication 1, caractérisée  
20 en ce que ledit polypeptide humain impliqué dans la reconnaissance et/ou l'activation cellulaire des cellules T est sélectionné dans le groupe composé des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (HLA), de la  $\beta$ 2-microglobuline, les chaînes des  
25 récepteurs des cellules T (TCR), les polypeptides du complexe CD3, des co-récepteurs CD4 et CD8, les molécules costimulatrices ICAM-1, CD80, CD86, CD40, CTLA-4, CD28, LFA-3.

30 3. Cellule selon la revendication 2, caractérisée en ce que ledit antigène du complexe majeur d'histocompatibilité est sélectionnée dans le groupe

composé des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de type I, de type II, de type III.

5        4. Cellule selon la revendication 3, caractérisée en ce que ladite séquence nucléotidique est liée de manière opérationnelle à des séquences de régulation de l'expression dudit gène animal endogène homologue.

10       5. Cellule selon la revendication 3, caractérisée en ce que ladite séquence nucléotidique est liée de manière opérationnelle à des séquences exogènes de régulation de l'expression.

15       6. Cellule selon la revendication 5, caractérisée en ce que lesdites séquences de régulation de l'expression exogènes sont les séquences de régulation de l'expression dudit gène humain codant pour le polypeptide humain.

20       7. Cellule selon les revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un transgène comprenant au moins tout ou partie d'une séquence nucléotidique codant pour au moins tout ou  
25       partie d'un polypeptide humain impliqué dans la reconnaissance antigénique et/ou l'activation cellulaire des cellules T présent sous forme épisomale dans ladite cellule, et en ce que ledit gène animal endogène homologue est invalidé dans ladite cellule.

30       8. Cellule selon la revendication 7, caractérisée en ce que ledit gène animal endogène homologue est



invalidé par recombinaison homologue ciblée (« Knock-Out »).

9. Cellule selon l'une des revendications 1 à 6,  
5 caractérisée en ce que la ou lesdites séquences  
nucléotidiques codent pour tout ou partie d'un antigène  
HLA de classe I humain et est ou sont insérées par  
insertion ciblée par recombinaison homologue (« Knock-  
In ») au niveau du ou des gènes animaux homologues  
10 codant le ou les antigènes animaux du complexe majeur  
d'histocompatibilité de classe I (CMH I).

10. Cellule selon l'une des revendications 1 à 6,  
caractérisée en ce que la ou lesdites séquences  
15 nucléotidiques codent pour tout ou partie des molécules  
HLA de classe II et est ou sont insérées par insertion  
ciblée par recombinaison homologue (« Knock-In ») au  
niveau du ou des gènes animaux homologues codant les  
antigènes animaux du complexe majeur  
20 d'histocompatibilité de classe II (CMH II).

11. Cellule selon l'une des revendications 1 à 6,  
caractérisée en ce que la ou lesdites séquences  
nucléotidiques codent pour tout ou partie des molécules  
25 HLA de classe I et de classe II et est ou sont insérées  
par insertion ciblée par recombinaison homologue  
(« Knock-In ») au niveau du ou des gènes animaux  
homologues codant le ou les antigènes animaux du  
complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH  
30 I) et de classe II (CMH II).

12. Cellule selon l'une des revendications 9 et 11, caractérisée en ce que ledit antigène HLA de classe I humain est choisi dans le groupe composé de HLA-A2, HLA-A24, HLA-A1, HLA-A3, HLA-B7, HLA-B27, HLA-B44, HLA-B8, HLA-B35, HLA-Cw7, HLA-Cw3, et caractérisée en ce que ledit antigène animal du CMH I est choisi parmi H2K, H2D et H2L.

13. Cellule selon l'une des revendications 10 et 11, caractérisée en ce que ledit antigène HLA de classe II humain est choisi dans le groupe composé de HLA-DR4, HLA-DR1, HLA-DR11, HLA-DR7, HLA-DR2, HLA-DR3, HLA-DQ8, HLA-DQ3, HLA-DP4, et caractérisée en ce que ledit antigène animal du CMH II est choisi parmi I-A alpha, I-A bêta, I-E alpha et I-E bêta.

14. Cellule selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que ladite séquence nucléotidique code pour tout ou partie de la  $\beta$ 2-microglobuline humaine, et est insérée par insertion ciblée par recombinaison homologue (« Knock-In ») au niveau du gène animal homologue codant la  $\beta$ 2-microglobuline.

15. Cellule selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la ou lesdites séquences nucléotidiques codent pour tout ou partie d'au moins un des polypeptides du complexe CD3 humain et est ou sont insérées par insertion ciblée par recombinaison homologue (« Knock-In ») au niveau du ou des gènes animaux homologues codant pour le ou les polypeptides du complexe CD3.

16. Cellule selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que ladite séquence nucléotidique code pour tout ou partie du polypeptide CD4 humain et est insérée par insertion ciblée par recombinaison  
5 homologue (« Knock-In ») au niveau du gène animal homologue codant pour le polypeptide CD4.

17. Cellule selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que ladite séquence nucléotidique  
10 code pour tout ou partie du polypeptide CD8 humain et est insérée par insertion ciblée par recombinaison homologue (« Knock-In ») au niveau du gène animal homologue codant pour le polypeptide CD8.

15 18. Cellule selon l'une des revendications 9 à 13, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre :

- a) ladite séquence nucléotidique codant pour tout ou partie de la  $\beta$ 2-microglobuline humaine, insérée par insertion ciblée par recombinaison homologue  
20 (« Knock-In ») au niveau du gène animal homologue codant la  $\beta$ 2-microglobuline ; et/ou
- b) ladite séquence nucléotidique codant pour tout ou partie du polypeptide CD4 humain, insérée par insertion ciblée par recombinaison homologue  
25 (« Knock-In ») au niveau du gène animal homologue codant pour le polypeptide CD4 ; et/ou
- c) ladite séquence nucléotidique codant pour tout ou partie du polypeptide CD8 humain, insérée par insertion ciblée par recombinaison homologue  
30 (« Knock-In ») au niveau du gène animal homologue codant pour le polypeptide CD8.

19. Cellule selon les revendications 16 à 18, caractérisée en ce que seule la partie extracellulaire des polypeptides CD4 et CD8 est humanisée.

5        20. Cellule selon les revendications 1 à 19, choisie dans le groupe composé des cellules de souris, rat, hamster, cobaye, lagomorphes, primates, dont l'homme, porcine, ovin, caprin, bovin, cheval.

10        21. Cellule de souris selon la revendication 20.

22. Cellule selon la revendication 21, caractérisée en ce qu'elles sont sélectionnées parmi les cellules des lignées murines consanguines (« inbred ») 129Sv,  
15 12901a, C57Bl6, BalB/C, DBA/2, les lignées non consanguines (« outbred ») et les lignées hybrides.

23. Cellule selon les revendications 1 à 22, caractérisée en ce que ladite cellule est choisie parmi  
20 les cellules du système immunitaire, les cellules présentatrices de l'antigène professionnelles et non professionnelles, les cellules souches hématopoïétiques, les cellules souches embryonnaires.

25        24. Cellule selon la revendication 23, caractérisée en ce que ladite cellule du système immunitaire est choisie parmi tous types de lymphocytes T matures et immatures, les thymocytes, les cellules dendritiques, les lymphocytes intra-épithéliaux, les cellules NK, les  
30 cellules B, monocytes, les cellules présentatrices de l'antigène professionnelles et non professionnelles.

25. Cellule souche selon la revendication 23, caractérisée en ce que ladite cellule souche est subséquentement différenciée en une cellule choisie parmi les cellules du système immunitaire selon la  
5 revendication 23.

26. Animal transgénique, non humain, comprenant au moins une cellule selon les revendications 1 à 25.

10 27. Animal selon la revendication 26, caractérisé en ce qu'il est sélectionné parmi la souris, le rat, le hamster, le cobaye, le lapin, les primates, les porcins, les ovins, les caprins, les bovins, le cheval.

15 28. Animal selon la revendication 27, caractérisé en ce que l'animal est une souris.

29. Animal selon les revendications 26 à 28, caractérisé en ce que les cellules de son système  
20 immunitaire expriment au moins un antigène HLA humain fonctionnel.

30. Animal selon la revendication 29, caractérisé en ce que les cellules de son système immunitaire  
25 expriment en outre des molécules co-réceptrices et co-stimulatrices humanisées et fonctionnelles.

31. Procédé de criblage d'un composé modulant une réaction immune chez l'homme, caractérisé en ce qu'il  
30 comprend les étapes de :

a) la mise en contact d'une cellule selon les revendications 1 à 25 et/ou d'un animal selon l'une

- des revendications 26 à 30 avec un immunogène responsable du déclenchement d'une réponse immune ;
- b) la mise en contact d'une cellule selon les revendications 1 à 25 et/ou d'un animal selon l'une  
5 des revendications 26 à 30 avec un immunogène responsable du déclenchement d'une réponse immune et, de manière simultanée ou décalée dans le temps, avec ledit composé ;
- c) la détermination et évaluation qualitative,  
10 facultativement quantitative, si une réaction immune se produit ;
- d) puis l'identification du composé qui induit sélectivement la réaction immune.
- 15 32. Procédé selon la revendication 31, caractérisé en ce que ladite détermination et/ou évaluation de ladite réaction immune est réalisée selon une technique choisie parmi :
- a) la détermination de la production de facteurs  
20 solubles tels que les chimiokines et les cytokines ;
- b) la détermination de la présence de récepteurs à la surface cellulaire ;
- c) la détermination de la prolifération cellulaire ;
- 25 d) la détermination des fonctions effectrices des cellules T (CTL, Helper...) ;
- e) la détermination de la production d'anticorps par les cellules B.
- 30 33. Procédé selon la revendication 31, caractérisé en ce que ladite détermination et/ou évaluation de

ladite réaction immune est réalisée par la mesure du taux d'expression d'un gène rapporteur.

34. Utilisation d'une cellule selon les  
5 revendications 1 à 25 et/ou d'un animal selon les revendications 26 à 30 pour l'analyse, l'étude et la modélisation des mécanismes moléculaires, biologiques, biochimiques, physiologiques et/ou physiopathologiques de la réaction immune chez l'homme.

10

35. Utilisation d'une cellule selon l'une des revendications 1 à 25, et ou d'un animal selon l'une des revendications 26 à 30 pour le criblage de composés modulant la réponse immune humaine.

15

36. Utilisation d'une cellule génétiquement modifiée ex vivo selon les revendications 1 à 25 pour la préparation d'une greffe cellulaire et ou tissulaire pour le traitement préventif et curatif d'un homme ou  
20 d'un animal nécessitant un tel traitement, caractérisée en ce que, lorsqu'un hôte allogénique est transplanté avec ladite cellule, celle-ci est moins fortement rejetée ou tolérée qu'une même cellule n'ayant pas été génétiquement modifiée, par le système immunitaire  
25 dudit hôte.

37. Utilisation selon la revendication 36, caractérisée en ce que ladite cellule est une cellule de souris, de porc, de bovin, de primate.

30

38. Utilisation selon les revendications 36 et 37, caractérisée en ce que ladite cellule selon les

revendications 1 à 25 exprime en outre au moins une protéine destinée au traitement préventif et curatif d'un homme ou d'un animal nécessitant un tel traitement, ladite protéine étant sélectionnée dans le  
5 groupe composé des cytokines, des interleukines, des chimiokines, des facteurs de croissance, des hormones, des anticorps.

10

15

20

25

30



International Application No  
PCT/FR 02/02475

IPC 7 C12N5/10 A01K67/027 G01N33/50 A61K35/14 A61K48/00

### B. FIELDS SEARCHED

IPC 7 C12N A01K G01N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

### C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 489 742 A (HAMMER ROBERT E ET AL) 6 February 1996 (1996-02-06)	1-35
Y	the whole document	36-38
X	WO 98 08943 A (MAYO FOUNDATION) 5 March 1998 (1998-03-05)	1-35
Y	the whole document	36-38
Y	WO 93 05817 A (HARVARD COLLEGE ;UNIV TUFTS (US)) 1 April 1993 (1993-04-01) the whole document	36-38
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

**Y** Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- T** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- X** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- Y** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- Z** document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

**28 November 2002**

Date of mailing of the international search report

19/12/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer \_\_\_\_\_

**Teyssier, B**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/02475

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>TOMASELLO E ET AL: "Combined natural killer cell and dendritic cell functional deficiency in KARAP/DAP12 loss-of-function mutant mice." IMMUNITY, vol. 13, no. 3, September 2000 (2000-09), pages 355-364, XP002222816 ISSN: 1074-7613</p> <hr/>	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No  
**PCT/FR 02/02475**

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5489742	A	06-02-1996	AU	8923191 A	20-05-1992
			WO	9207070 A1	30-04-1992
WO 9808943	A	05-03-1998	WO	9808943 A1	05-03-1998
			AU	7235596 A	19-03-1998
WO 9305817	A	01-04-1993	AU	2661692 A	27-04-1993
			WO	9305817 A1	01-04-1993

PCT/FR 02/02475

CIB 7 C12N5/10 A01K67/027 G01N33/50 A61K35/14 A61K48/00

CIB 7 C12N A01K G01N A61K

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

X	US 5 489 742 A (HAMMER ROBERT E ET AL) 6 février 1996 (1996-02-06)	1-35
Y	le document en entier	36-38
X	WO 98 08943 A (MAYO FOUNDATION) 5 mars 1998 (1998-03-05)	1-35
Y	le document en entier	36-38
Y	WO 93 05817 A (HARVARD COLLEGE ;UNIV TUFTS (US)) 1 avril 1993 (1993-04-01)	36-38
	le document en entier	

—/—

**Y** Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\*& document qui fait partie de la même famille de brevets

19/12/2002

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3018

**Teyssier, B**

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>TOMASELLO E ET AL: "Combined natural killer cell and dendritic cell functional deficiency in KARAP/DAP12 loss-of-function mutant mice." IMMUNITY, vol. 13, no. 3, septembre 2000 (2000-09), pages 355-364, XP002222816 ISSN: 1074-7613</p>	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 02/02475

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication		Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5489742	A	06-02-1996	AU	8923191 A	20-05-1992
			WO	9207070 A1	30-04-1992
WO 9808943	A	05-03-1998	WO	9808943 A1	05-03-1998
			AU	7235596 A	19-03-1998
WO 9305817	A	01-04-1993	AU	2661692 A	27-04-1993
			WO	9305817 A1	01-04-1993